



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 33 394 A 1**

⑥① Int. Cl.⁷:
A 61 K 39/395

②① Aktenzeichen: 101 33 394.3
②② Anmeldetag: 13. 7. 2001
④③ Offenlegungstag: 30. 1. 2003

DE 101 33 394 A 1

⑦① Anmelder:
Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt, DE

⑦② Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

⑤⑥ **Entgegenhaltungen:**

US 59 45 098 A
EP 03 59 282 A2

Abstr.: Mendelsohn J u. Baselga J.: The EGF
receptor family as targets for cancer therapy. In:
Oncogene, 2000, Vol. 19, H. 56, s. 6550-6565;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **Flüssige Formulierung enthaltend Cetuximab**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft eine stabile flüssige pharmazeuti-
sche Formulierung, enthaltend Cetuximab, einen chimä-
ren monoklonalen Antikörper gegen den Rezeptor des en-
dothelialen Wachstumsfaktors (EGF-Rezeptor). Die For-
mulierung weist eine erhöhte Lagerstabilität auf und kann
parenteral zur Behandlung von Tumoren verwendet wer-
den.

DE 101 33 394 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine stabile flüssige pharmazeutische Formulierung enthaltend Cetuximab, einen chimären monoklonalen Antikörper gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Rezeptor).

5 **[0002]** In verschiedenen in vitro und in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass Blockade des EGF-Rezeptors durch Antikörper auf unterschiedlichen Ebenen gegen Tumore wirken, beispielsweise durch Hemmung der Krebszellproliferation, Verringerung der tumorvermittelten Angiogenese, Induktion der Krebszellapoptose und Verstärkung der toxischen Wirkungen der Strahlentherapie und der herkömmlichen Chemotherapie. Cetuximab ist vielversprechender Antikörper, der an den EGF-Rezeptor bindet. Cetuximab wird aus der DNA unterschiedlicher Spezies rekombiniert und ist in
10 EP 0359 282 beschrieben. Im Hinblick auf die Herstellung von Cetuximab wird auf die genannte EP-Druckschrift verwiesen.

[0003] Wie andere Antikörper wird Cetuximab zur therapeutischen Anwendung parenteral als Lösung appliziert. Ein besonderes Problem von Lösungen mit Antikörpern ist deren Neigung zur Aggregation und zur Bildung von Proteinmultimeren. Im Falle reproduzierbarer Multimere kann dies auf nicht beabsichtigte intermolekulare Disulfidbrückenbildung
15 durch eine Interaktion zwischen sich annähernden Molekülteilen zurückgeführt werden. Auch kommen hydrophobe Wechselwirkungen und die damit verbundene Bildung nichtreduzierbarer Multimere in Betracht. Weiterhin kommt es zu Deamidierungsreaktionen, die nachfolgend zu Proteinabbaureaktionen führen.

[0004] Infolge der genannten Aggregationsneigung kommt es bei Lagerung von Antikörperlösungen zu Produktausfällungen, so dass eine reproduzierbare Entnahme aus dem die Lösung enthaltenden Behältnis in Frage gestellt ist. Hinzu
20 kommt, dass es bei parenteraler Applikation partikelhaltiger Lösung zu Embolien kommen kann. Das hat zur Folge, dass eine reproduzierbare Verabreichung der jeweils erforderlichen Dosis an den Patienten nicht gewährleistet ist und die Applikation nicht mit der erforderlichen Sicherheit erfolgen kann. Durch Filtration vor Injektion können die Aggregate zwar zurückgehalten werden. Dieses Verfahren beinhaltet aber einen zusätzlichen Schritt und ist daher aufwendig und für die klinische Praxis wenig geeignet. Auch verbleibt das Problem der Dosisreproduzierbarkeit ungelöst, da jeweils ein
25 unbekannter Anteil an Antikörpern aus der Lösung abgetrennt wird und Partikelbildung nach Filtration weiterhin ein Sicherheitsrisiko darstellt.

[0005] Ein gebräuchliches Verfahren zur Stabilisierung von monoklonalen Antikörpern ist die Gefriertrocknung von Lösungen, die Antikörper sowie Hilfsstoffe enthalten. Lyophilisation ist jedoch sehr Zeit- und energieaufwendig und damit
30 teuer. Auch muss das Lyophilisat vor Verabreichung erst rekonstituiert werden.

[0006] EP 0 073 371 beschreibt intravenös verabreichbare Zusammensetzungen mit Immunglobulinen die zur Stabilisierung einen pH-Wert von 3,5 bis 5,0 aufweisen. Derart niedrige pH-Werte führen aber zu unerwünschten Unverträglichkeitsreaktionen an der Injektionsstelle.

[0007] US 6,171,586 B1 offenbart die Verwendung von einem Acetatpuffer pH 4,48 bis 5,5, einem Surfactant und einem Polyol in einer flüssigen Formulierung von Antikörpern, wobei NaCl zur Isotonisierung ausgeschlossen ist. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes sowie der fehlenden Isotonisierung kann es ebenfalls zu Unverträglichkeitsreaktionen an
35 der Injektionsstelle kommen.

[0008] Als Beispiele weiterer Formulierungen mit speziellen Antikörpern seien an dieser Stelle EP 0 280 358, EP 0 170 983 und US 5,945,098 genannt.

[0009] Hiervon beschreibt EP 0 280 358 den Zusatz von Dextran zu einer Antikörperlösung zur Stabilisierung gegen
40 bestimmte Hormone, wobei eine Stabilität über neun Monate erreicht wurde.

[0010] EP 0 170 983 beschreibt die Stabilisierung eines thermolabilen monoklonalen Antikörpers durch Erhitzen zusammen mit hydrolysiertem Ovalbumin, wodurch der Antikörper nach 7 Tagen Lagerung bei 45°C noch stabil war. Der Zusatz von Proteinen anderer Species zu verabreichbaren Formulierungen, die zur parenteralen Verabreichung vorgesehen sind, sind aufgrund der hiermit verbundenen Problematik, insbesondere deren möglichen Antigenität, aber unerwünscht.
45

[0011] US 5,945,098 offenbart die Verwendung von Glycin, Polysorbat 80 und Polyethylenglycol zur Stabilisierung einer flüssigen Formulierung von Immunglobulin G.

[0012] Es war Aufgabe der Erfindung speziell für Cetuximab eine zur parenteralen Verabreichung geeignete flüssige Formulierung zu finden, die gut verträglich ist und bei Lagerung bei Raumtemperatur über mindestens ein Jahr stabil ist.
50 Die Formulierung sollte einfach aufgebaut sein und keine aus toxikologischer Sicht bedenklichen Hilfsstoffe enthalten.

[0013] Überraschenderweise konnte eine diesen Anforderungen entsprechende Formulierung mit einer Lösung gefunden werden, die neben Cetuximab einen Phosphatpuffer im Bereich von circa pH 6 bis circa pH 8 sowie ein Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester enthält. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine stabile flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, die einen Phosphatpuffer im Bereich von pH 6 bis pH 8 sowie einen Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester enthält. Bevorzugt liegt der pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5, besonders bevorzugt ist ein pH-Wert von
55 circa 7,2.

[0014] Als Phosphatpuffer einsetzbar sind Lösungen der Mono- und/oder Di-Natrium- und Kaliumsalze der Phosphorsäure, wie Dinatriumhydrogenphosphat oder Kaliumdihydrogenphosphat, sowie Mischungen der Natrium- und Kaliumsalze, wie beispielsweise Mischungen aus Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat. Der Phosphatpuffer kann in der erfindungsgemäßen Formulierung in einem Konzentrationsbereich von 2 mM bis 100 mM enthalten sein. Bevorzugt ist ein Konzentrationsbereich von 5 mM bis 20 mM, besonders bevorzugt sind circa 10 mM.
60

[0015] Cetuximab kann in der erfindungsgemäßen Formulierung in einer Konzentration von 0,1 mg/ml bis 25 mg/ml enthalten sein. Bevorzugt sind 2 mg/ml bis 10 mg/ml, besonders bevorzugt circa 5 mg/ml enthalten.

[0016] Als Polyethylen-Sorbitan-Fettsäureester sind auch unter dem Warenzeichen Tween bekannt. In der erfindungsgemäßen Formulierung verwendbar sind insbesondere Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat, Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonopalmitat und Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonostearat. Bevorzugt sind Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat und Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat, hiervon besonders bevorzugt ist Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat. Die Polyethylen-Sorbitan-Fettsäureester können in der Formulierung in einer Konzentration von 0,001% bis
65

DE 101 33 394 A 1

1,0% enthalten sein. Bevorzugt sind 0,005% bis 0,1%, besonders bevorzugt circa 0,01% enthalten.

[0017] Vorteilhaft enthält die erfindungsgemäße Formulierung zusätzlich ein Isotonisierungsmittel, bevorzugt ein physiologisch verträgliches Salz, wie beispielsweise Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, oder ein physiologisch verträgliches Polyol, wie beispielsweise Glucose oder Glycerin, in einer zur Isotonisierung erforderlichen Konzentration. Gegenstand der Erfindung ist daher eine flüssige Formulierung enthaltend Cetuximab, einen Phosphatpuffer im Bereich von circa pH 6 bis circa pH 8, einen Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester sowie ein Isotonisierungsmittel in einer zur Isotonisierung erforderlichen Konzentration. Bevorzugt enthält die Formulierung Natriumchlorid als Isotonisierungsmittel.

[0018] Nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung enthält die flüssige Formulierung circa 5 mg/ml Cetuximab, circa 10 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von circa 7,2, circa 145 mM Natriumchlorid sowie circa 0,01% Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat.

[0019] Die erfindungsgemäße Formulierung kann hergestellt werden, indem einer Cetuximab enthaltenden Lösung die genannten Inhaltsstoffe zugefügt werden. Zweckmäßigerweise wird hierzu einer Lösung mit einer definierten Konzentration an Cetuximab, wie sie bei dessen Herstellung gewonnen wird, mit definierten Volumina an Stammlösungen, die die genannten weiteren Inhaltsstoffe in definierter Konzentration enthalten, versetzt und gegebenenfalls mit Wasser auf die vorberechnete Konzentration verdünnt. Alternativ können die Inhaltsstoffe der Cetuximab enthaltenden Ausgangslösung auch als Feststoffe zugesetzt werden. Liegt Cetuximab als Feststoff, beispielsweise als Lyophilisat, vor, kann die erfindungsgemäße Formulierung hergestellt werden, indem Cetuximab zunächst in Wasser oder einer einen oder mehrere der weiteren Inhaltsstoffe enthaltenden wässrigen Lösung gelöst und anschließend mit den jeweils erforderlichen Mengen an die weiteren Inhaltsstoffe enthaltenden Stammlösungen, mit den weiteren Inhaltsstoffen in fester Form und/oder Wasser versetzt werden. Zweckmäßigerweise kann Cetuximab auch direkt in einer alle weiteren Inhaltsstoffe enthaltenden Lösung gelöst werden.

[0020] Vorteilhaft kann einer oder mehrere der in der erfindungsgemäßen Formulierung enthaltenen Inhaltsstoffe bereits während oder zum Schluss des Herstellungsverfahrens von Cetuximab zugegeben werden. Bevorzugt kann dies dadurch erfolgen, indem Cetuximab im letzten Schritt der nach seiner Herstellung erfolgenden Aufreinigung direkt in einer einen, mehrere oder alle weiteren Inhaltsstoffe enthaltenden wässrigen Lösung gelöst wird. Dann müssen zur Herstellung der Formulierung die jeweiligen weiteren Inhaltsstoffe nur noch in jeweils geringerer Menge und/oder gar nicht zugesetzt werden. Besonders bevorzugt ist, wenn der jeweilige Inhaltsstoff im letzten Schritt der nach seiner Herstellung erfolgenden Aufreinigung direkt in einer alle weiteren Inhaltsstoffe enthaltenden wässrigen Lösung gelöst wird, so dass die erfindungsgemäße Formulierung direkt erhalten wird.

[0021] Die Beispiele, ohne darauf beschränkt zu sein, erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

[0022] Wässrige Lösung enthaltend:

5 mg/ml Cetuximab

10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2

45 mM Natriumchlorid

0,01 Gew.-% Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat.

[0023] Die Herstellung erfolgte durch Mischung definierter Volumina von die jeweiligen Inhaltsstoffe in definierter Konzentration enthaltenden wässrigen Lösungen. Folgende Lösungen wurden verwendet:

[0024] Lösung A (Wirkstofflösung) enthaltend:

9,7 mg/ml Cetuximab

10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 (bestehend aus 2,07 g/l

Dinatriumhydrogenphosphat-7-hydrat und 0,31 g/l

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat)

145 mM Natriumchlorid.

[0025] (Die Lösung wurde erhalten, indem der Wirkstoff im letzten Schritt der nach dessen Herstellung erfolgenden chromatographischen Wirkstoffaufreinigung mit Lösung B von der Säule eluiert wurde.)

[0026] Lösung B (Puffer/Salz-Lösung):

entspricht Lösung A, enthält jedoch kein Wirkstoff.

[0027] Lösung C (Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester-Lösung):

entspricht Lösung B, enthält jedoch zusätzlich 1 Gew.-% Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat.

[0028] Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Formulierung wurden 10 ml Lösung A, 9,8 ml Lösung B und 0,2 ml Lösung C miteinander vereinigt.

[0029] Die zubereitete Lösung wurde vor der Abfüllung mit einem Sterilfilter filtriert. Die Vials wurden mit einer Pipette mit je 2 ml Lösung befüllt. Anschließend wurden die Vials mit Stopfen verschlossen und gebördelt.

Beispiel 2 (Vergleichsformulierung)

[0030] Wässrige Lösung enthaltend:

5 mg/ml Cetuximab

10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2

145 mM Natriumchlorid.

[0031] Zur Herstellung der Vergleichsformulierung wurden jeweils 10 ml der in Beispiel 1 beschriebenen Lösungen A und B miteinander vereinigt.

DE 101 33 394 A 1

Beispiel 3

[0032] Wässrige Lösung enthaltend:

2 mg/ml Cetuximab

5 0,1 Gew.-% Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat

20 mM Dinatriumhydrogenphosphat

5 Gew.-% Glucose.

[0033] Die Herstellung erfolgte durch Mischung definierter Volumina von die jeweiligen Inhaltsstoffe in definierter Konzentration enthaltenden wässrigen Lösungen. Folgende Lösungen wurden verwendet:

10 Lösung A:

Wässrige Lösung enthaltend:

4 mg/ml Cetuximab

20 mM Dinatriumhydrogenphosphat.

15 (Die Lösung wurde erhalten, indem der Wirkstoff im letzten Schritt der nach dessen Herstellung erfolgenden chromatographischen Wirkstoffaufreinigung mit Lösung B von der Säule eluiert wurde.)

Lösung B (Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester-Glucose-Lösung):

0,2 Gew.-% Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat

10 Gew.-% Glucose

20 mM Dinatriumhydrogenphosphat.

20 [0034] Zur Herstellung wurden 10 ml Lösung A und 10 ml Lösung B miteinander vereinigt.

[0035] Die zubereitete Lösung wurde vor der Abfüllung mit einem Sterilfilter filtriert. Die Vials wurden mit einer Pipette mit je 2 ml Lösung befüllt. Anschließend wurden die Vials mit Stopfen verschlossen und gebördelt.

Beispiel 4

25

[0036] Die Stabilität der erfindungsgemäßen Formulierung wurde in einem Stresstest geprüft. Hierzu wurden Vials enthaltend die Lösung gemäß Beispiel 1 sowie zu Vergleichszwecken Vials enthaltend Lösung gemäß Beispiel 2 bei 40°C und 75% relativer Luftfeuchte eingelagert. Vor Einlagerung sowie nach definierten Lagerzeiten wurden jeweils 3 Vials visuell bei direkter Anstrahlung mit einer Kaltlichtquelle beurteilt und die Absorption der Lösungen bei 350 und 30 550 nm bestimmt, die ein Maß für die Trübung darstellt. Weiterhin wurden jeweils 3 Vials entnommen und hinsichtlich des Gehaltes an Cetuximab und Zersetzungsprodukten mittels HPLC-Gelfiltration untersucht.

[0037] Die HPLC-chromatographischen Untersuchungen erfolgte mit Gradienten aus Acetonitril/Wasser 95/5 (V/V) (B) und Pufferlösung pH 2,5/Acetonitril 95/5 (V/V) (A) als Eluenten. Säule: LiChroCHART® HPLC-Kartusche 125-2; Superspher® 60 RP-select B, Fluss: 0,3 ml/min, Detektion bei 210 nm.

35 [0038] Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

40

45

50

55

60

65

DE 101 33 394 A 1

Tabelle 1

Prüfungs- lösung	Lage- rung [Wo- chen]	Cetuxi- -mab [%]	Neben- zonen [%]	Zerset- zungs- produkte [%]	Trübung bei $\lambda =$ 350 nm	Trübung bei $\lambda =$ 550 nm	visuel- le Beur- teilung
Beispiel 1	0	99,72	0,11	0,17	0,0128	0,0016	klar
Beispiel 1	4	98,60	0,84	0,56	0,0200	0,0022	klar
Beispiel 1	8	96,49	1,30	2,21	0,0280	0,0033	klar
Beispiel 2	0	99,69	0,15	0,16	0,0130	0,0021	klar
Beispiel 2	4	92,00	7,38	0,62	0,0232	0,0047	kleine Partikel

[0039] Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die erfindungsgemäße Formulierung gegenüber der Vergleichslösung eine deutlich erhöhte Stabilität aufweist.

Patentansprüche

1. Flüssige pharmazeutische Formulierung enthaltend Cetuximab, einen Phosphatpuffer pH 6 bis pH 8 sowie einen Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester.
2. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass diese einen pH-Wert von pH 6,5 bis pH 7,5 aufweist.
3. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass diese einen pH-Wert von circa pH 7,2 aufweist.
4. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Phosphatpuffer in einer Konzentration von 2 mM bis 100 mM enthalten ist.
5. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Phosphatpuffer in einer Konzentration von 5 mM bis 20 mM, vorzugsweise 10 mM, enthalten ist.
6. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat oder Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat enthalten ist.
7. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester in einer Konzentration von 0,005% bis 0,1%, insbesondere in einer Konzentration von circa 0,01% enthalten ist.
8. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass weiterhin ein Isotonisierungsmittel in einer zur Isotonisierung erforderlichen Konzentration enthalten ist.
9. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Natriumchlorid als Isotonisierungsmittel enthalten ist.
10. Flüssige pharmazeutische Formulierung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass diese circa 5 mg/ml Cetuximab, circa 10 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von circa 7,2, circa 145 mM Natriumchlorid sowie circa 0,01% Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat enthält.

- Leerseite -